

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 495 347 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: **91870219.2**

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 27/447**

(22) Date de dépôt: **23.12.91**

Une requête en rectification en ajoutant un verbe à la phrase de la page 6 ligne 29 de la description a été présentée conformément à la règle 88 CBE. Il est statué sur cette requête au cours de la procédure engagée devant la division d'examen (Directives relatives à l'examen pratiqué à l'OEB, A-V, 2.2).

(30) Priorité: **15.01.91 BE 9100027**

(43) Date de publication de la demande:
22.07.92 Bulletin 92/30

(84) Etats contractants désignés:
BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

(71) Demandeur: **ANALIS S.A.**
14 rue Dewez
B-5000 Namur(BE)

(72) Inventeur: **Chevigne, Roland**
9, Rue des Forts
B-5100 Wepion(BE)
Inventeur: **Janssen, Jacques**
288 Chaussée de la Hulpe
B-1170 Bruxelles(BE)

(74) Mandataire: **Van Malderen, Michel**
p.a. Office van Malderen 85/043 Boulevard de
la Sauvenière
B-4000 Liège(BE)

(54) **Procédé de séparation de l'hémoglobine glycosylée HB A1C par électrophorèse sur gel d'agarose.**

(57) Suivant l'invention, on utilise comme milieu de support pour l'électrophorèse un gel d'agarose contenant du sulfate de chondroïtine, pour séparer l'hémoglobine glycosylée Hb A1c des autres types d'hémoglobines.

Une analyse densitométrique du gel après électrophorèse permet une quantification du pourcentage de chaque type d'hémoglobine contenu dans l'échantillon.

EP 0 495 347 A1

Objet de l'invention

La présente invention concerne un procédé électrophorétique réalisé sur gel d'agarose permettant de séparer l'hémoglobine glycosylée par le glucose Hb A1c, présente dans un échantillon de sang, non
 5 seulement des hémoglobines non-glycosylées mais également des autres types d'hémoglobines glycosylées comme Hb A1a et Hb A1b par exemple, de l'hémoglobine foetale, et éventuellement d'hémoglobines anormales.

Après séparation par le procédé de l'invention, une analyse densitométrique classique permet une quantification du pourcentage de chaque type d'hémoglobine présent dans l'échantillon.

Arrière-plan technologique

La surveillance de l'évolution du diabète d'un patient peut s'effectuer par contrôle du taux de glucose dans le sang. On sait cependant que l'évolution de celui-ci est particulièrement rapide. Les dosages de
 15 glucose ne peuvent donner que des indications ponctuelles sur la glycémie du patient, et ne reflètent donc pas l'évolution de celle-ci dans les semaines précédant l'analyse.

On sait par ailleurs que la détermination quantitative de l'hémoglobine glycosylée Hb A1 reflète la concentration du glucose sanguin moyen d'un patient sur une période de deux mois précédant la prise de sang.

Pour cette raison, les dosages d'hémoglobine glycosylée (encore appelée glyquée) sont fréquemment utilisés dans les laboratoires d'analyse médicale.

L'hémoglobine est constituée de quatre chaînes peptidiques avec un groupement hème. La principale hémoglobine du sujet adulte normal est l'hémoglobine A, constituée de deux chaînes α et de deux chaînes β .

L'hémoglobine A1c est formée par glycosylation non-enzymatique des chaînes β de l'hémoglobine A par fixation du glucose sur les extrémités NH_2 libres des valines N-terminales de chaque chaîne β .

L'analyse biochimique montre que cette fraction Hb A1c contient une mole de glucose par mole d'hémoglobine.

L'hémoglobine glycosylée totale Hb A1 comprend également les fractions A1a, A1b, A1d et A1e. La première contient du glucose-6-phosphate au lieu de glucose non phosphorylé; les trois autres sont encore
 30 actuellement mal connues, mais il ne semble pas qu'il y ait corrélation entre ces fractions et l'équilibre glycémique.

Résumé de l'état de la technique

Différents procédés sont utilisés pour séparer les hémoglobines glycosylées.

Plusieurs méthodes chromatographiques donnent un résultat satisfaisant du point de vue du résultat obtenu mais sont généralement lentes et coûteuses.

Il est par exemple connu de pratiquer une chromatographie d'affinité en utilisant la propriété de
 40 l'hémoglobine glycosylée de se fixer à l'acide m-aminophénylborique lié à un gel d'agarose, en éluant à l'aide de deux tampons appropriés.

La chromatographie sur résine échangeuse de cations faiblement acide permet la séparation de différentes fractions d'hémoglobine par élution au moyen de tampons de force ionique et pH différents. De telles techniques sont par exemple décrites dans les brevets US-A-4,389,491 et US-A-4,407,961. Ces
 45 techniques chromatographiques sont sensibles aux variations de température et les analyses sont souvent entachées d'erreurs par des échantillons contenant de l'hémoglobine foetale (HbF) ou des hémoglobines anormales (HbS, HbC).

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) fournit de bons résultats et il existe des analyseurs automatisés coûteux qui permettent des analyses en grande série.

Parmi les techniques électrophorétiques, il est connu de séparer électriquement les différents composants de l'hémoglobine selon leur point isoélectrique sur un gel de polyacrylamide en gradient de pH (séparation par isoélectrofocalisation); cette technique permet de détecter des hémoglobines anormales, mais l'HbF interfère avec la Hb A1 c, qui migre au même endroit; en outre un dosage densitométrique est
 55 difficilement applicable à cette technique. Il est à noter que l'interférence Hb A1c/HbF pose des problèmes en particulier pour la surveillance du diabète chez les femmes enceintes.

Le brevet US-A-4,222,836 mentionne une technique de séparation d'hémoglobines glycosylées sur gel d'agar contenant un tampon citrate. Celle-ci permet la séparation d'une part de l'hémoglobine non glycosylée Ao et d'autre part de l'ensemble des hémoglobines glycosylées Hb A1 a, b, c, qui migrent

toutes au même endroit. Cette technique nécessite un contrôle rigoureux de la teneur en sulfate de l'agar utilisé.

Des résultats similaires obtenus par électrophorèse sur gel d'agar sont mentionnés dans les articles suivants: Menard L. et al., Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A1 by agar gel electrophoresis, in Clin. Chem. 26, 1075 (1979), et Aleyassine H. et al., Agar gel electrophoretic determination of glycosylated hemoglobin: effect of variant hemoglobins, hyperlipidemia and temperature, in Clin. Chem. 27/3, 472-475 (1981).

Le brevet US-A-4 351 711 (J. AMBLER) décrit un procédé d'électrophorèse qui permet la séparation de l'hémoglobine glycosylée des autres fractions d'hémoglobine. Suivant ce document, on inclut du sulfate de dextran dans un échantillon de sang ou dans le tampon d'électrophorèse. Le support utilisé peut être un gel d'agar conventionnel ou de l'acétate de cellulose.

Les limitations de ce procédé sont soulignées par son auteur même (J. AMBLER) dans "Measurement of Glycosylated Hemoglobin on Cellulose Acetate Membranes by mobile Affinity Electrophoresis", Clin. Chem. 1983; 29:340-343: à savoir l'interférence de l'hémoglobine foetale (HbF), la non-séparation de HbA1a, HbA1b, la nécessité de colorer le gel et donc l'impossibilité de travailler sur sang total. Il faut utiliser des hémolysats de globules rouges lavés ce qui implique davantage d'étapes et énormément de main d'oeuvre.

L'article d'Aleyassine H., Determination of glycosylated hemoglobin by affinity electrophoresis on agarose gel, in Clinica Chimica Acta, 142, 123-130, (1984) décrit une technique analogue qui permet de même obtenir une séparation de l'ensemble des hémoglobines glycosylées d'avec les hémoglobines non-glycosylées. Selon le procédé décrit, on ajoute du sulfate de dextran à un gel d'agarose. Après électrophorèse, l'hémoglobine foetale migre au même endroit que l'hémoglobine glycosylée ce qui crée une interférence. HbA1a et HbA1b ne sont pas séparés.

En outre, l'auteur signale dans cet article que les résultats obtenus sont fortement dépendants de la source de sulfate de dextran utilisée. La Demanderesse a d'ailleurs pu constater que des lots différents d'une même qualité de sulfate de dextran d'un même fournisseur pouvaient ne pas donner des résultats, ce qui rend cette technique difficilement exploitable.

Il n'existe donc pas actuellement à la connaissance de la Demanderesse de procédé électrophorétique qui permette d'obtenir une bonne séparation de l'hémoglobine glycosylée Hb A1c des hémoglobines non-glycosylées, et des autres types d'hémoglobines glycosylées, tout en ne présentant pas d'interférence avec des hémoglobines anormales telles que l'hémoglobine foetale HbF, et en permettant un dosage des constituants par densitométrie après la séparation électrophorétique.

Buts visés par l'invention

L'invention a pour but de fournir un procédé électrophorétique permettant d'obtenir de tels résultats, tout en étant bon marché, pratique et facile à utiliser.

Elle a encore pour but de fournir un tel procédé qui permette également d'identifier différentes hémoglobines anormales.

Un autre but de l'invention est de fournir des trousseaux comprenant un gel d'agarose permettant l'exécution du procédé électrophorétique de l'invention.

Éléments caractéristiques de l'invention

L'invention a pour objets un procédé de préparation de gel d'agarose dans lequel on ajoute un polysaccharide sulfaté, en particulier du sulfate de chondroïtine, et les gels d'agarose susceptibles d'être obtenus par ce procédé.

Le sulfate de chondroïtine peut être choisi dans un groupe comprenant le sulfate de chondroïtine A, le sulfate de chondroïtine B, le sulfate de chondroïtine C et un mélange de deux ou plusieurs de ces composés.

Le sulfate de chondroïtine utilisé peut être extrait de diverses espèces animales: il en existe divers types dans le commerce qui peuvent être obtenus par exemple à partir de côte ou de peau de porc, de trachée ou de cornée de boeuf, ou de cartilages de requin ou de baleine.

Des essais d'électrophorèse avec des gels contenant ces différents types de sulfate de chondroïtine, employés seuls ou en mélange, ont donné de bons résultats, indépendamment de leur origine, et de leur poids moléculaire. L'observation des gels a permis une identification de l'hémoglobine glycosylée Hb A1c.

Le sulfate de chondroïtine peut être contenu dans un tampon d'équilibration, avantageusement à une concentration de 0,1 à 3% dudit tampon, de préférence à une concentration de 0,5 à 1% dudit tampon. Le

EP 0 495 347 A1

pH de celui-ci généralement compris entre 5 et 6, de préférence entre 5,2 et 5,8.

Le tampon peut contenir un acide choisi parmi les acides maléique, phtalique, 2-3-pyridine dicarboxylique, succinique, dibromosuccinique, mucique, diglycolique, malique et adipique, et une base choisie parmi les suivantes: Tris, NaOH, KOH, D-L méthylglucamine, imidazole et pipérazine.

Il va de soi que d'autres acides et bases acceptables peuvent être utilisés.

D'une manière préférée, le sulfate de chondroïtine est ajouté à l'agarose avant solidification du gel. Le gel peut également être mis à équilibrer dans du tampon d'équilibration contenant du sulfate de chondroïtine.

On peut donc utiliser de la sorte un gel exempt de sulfate de chondroïtine, tel que par exemple un gel Beckman Paragon SPE, pour l'identification de l'hémoglobine glycosylée Hb A1c, sans sortir du cadre de l'invention. L'équilibration dure habituellement 30 minutes.

Un autre objet de l'invention est une trousse pour l'électrophorèse d'hémoglobine comprenant un gel d'agarose obtenu suivant le procédé de l'invention, le cas échéant un tampon d'équilibration contenant du sulfate de chondroïtine, et un tampon d'électrophorèse. De préférence, le tampon d'électrophorèse est identique au tampon d'équilibration (mais ne contient éventuellement pas de sulfate de chondroïtine).

L'invention est illustrée par les exemples de gels électrophorétiques repris ci-dessous (exemples 1 à 7) et par un exemple de mise en oeuvre (exemple 8).

Exemples 1 à 7 (préparation)

Des solutions standard d'agarose sont préparées de la manière suivante: 10 g d'agarose sont versés dans 830 ml d'eau distillée sous forte agitation. Le mélange est chauffé progressivement jusqu'à 95 ° C puis refroidi aux alentours de 55 ° C. Sous agitation, 170 ml d'une solution concentrée contenant un ou plusieurs acides ou substances à comportement acide, une ou plusieurs bases, et éventuellement un agent de préservation comme l'azoture de sodium par exemple.

Du sulfate de chondroïtine, ainsi que des adjuvants connus permettant d'obtenir les caractéristiques de gel souhaitées (texture, rétention d'eau) sont ajoutées à ces solutions standard. Après homogénéisation, on procède au coulage des gels d'agarose (200 à 250 gels de 10 x 7,5 cm) sur un support adéquat.

Ex.	Acide	Base	Azoture	Autre	Sulfate de chondroïtine
1.	Maléique 8,2 g	TRIS 11,9 g	0,59 g	-	7,84 g
2.	Malique 9,2 g	TRIS 14,5 g	1 g	-	6,51 g
3.	Maléique 8,7 g	TRIS 11,8 g	0,21 g	Hydrogénophthalate de potassium 1,3 g	10 g
4.	Phtalique 8,02 g	TRIS 10,8 g	1 g	MOPSO 10,1 g	10 g
5.	2,3 Pyridine dicarboxylique 8 g	TRIS 10,9 g	1 g	MES 5,04 g	8,61 g
6.	Maléique 10 g	Imidazole 5,2 g	0,4 g	Na SCN 2 g	5,3 g
7.	Maléique 5,47 g	TRIS 7,79 g		Hydrogénophthalate de potassium 0,82 g Na SCN 1,5 g	6,47 g

Exemple 8 (mise en oeuvre)

Un gel obtenu selon une des préparations décrites en exemples 1, 2, 3, est déposé sur la table, buvardé pour enlever l'excès de tampon. Des hémolysats de sang total ou de globules rouges sont appliqués selon un procédé courant en électrophorèse. Le gel est alors soumis à une électrophorèse de 50

V pendant 20 à 40 minutes ou de 100 V pendant 10 à 20 minutes en utilisant de préférence dans le tampon d'électrophorèse les acides et bases employés pour la préparation de la solution standard d'agarose pour la fabrication du gel. Après l'électrophorèse, le gel est rincé à l'eau distillée, le support de gel parfaitement essuyé, puis on procède à une lecture densitométrique à 415 nm, permettant de déceler la présence d'hémoglobines anormales et de calculer le pourcentage d'hémoglobine glycosylée HbA1c par rapport à une ou plusieurs des hémoglobines présentes dans l'échantillon.

Alternativement le gel peut être séché puis lu par densitométrie, une fois sec. Une variante peut consister à colorer le gel de façon à en permettre la lecture avec un densitomètre à faible sensibilité, ou pour en permettre l'archivage. Cette coloration peut être obtenue en utilisant un réactif colorant les protéines (en tenant compte que des protéines autres que hémoglobine peuvent réagir) ou un colorant spécifique de l'hémoglobine y compris les techniques mettant en oeuvre des propriétés antigène-anticorps.

Des résultats expérimentaux ont montré notamment qu'il est possible en utilisant les gels suivant l'invention de mettre en évidence sans confusion possible, des bandes bien définies correspondant aux hémoglobines suivantes: Hb Ao, méthémoglobine, Hb A1c, HbF, Hb A1b et Hb A1a.

Bien que les exemples ci-dessus illustrent des formes d'exécution avantageuses de l'invention, ils n'en limitent pas la portée.

Au cas où on dispose d'un gel pour électrophorèse ne contenant pas de sulfate de chondroïtine, par exemple d'un gel Beckman Paragon SPE, on ne sortira pas du cadre de l'invention si on laisse équilibrer un tel gel pendant par exemple 30 minutes dans un tampon d'équilibration contenant des acides et bases tels que mentionnés dans les exemples ci-dessus, et du sulfate de chondroïtine. Bien que le procédé soit plus long, les résultats obtenus sont tout à fait similaires.

On ne sortira pas non plus du cadre de l'invention en ajoutant du sulfate de chondroïtine à un gel d'agarose contenant un autre polysaccharide sulfaté.

Revendications

1. Procédé de préparation de gel d'agarose dans lequel on ajoute à l'agarose un polysaccharide sulfaté caractérisé en ce qu'on ajoute à l'agarose du sulfate de chondroïtine.
2. Procédé suivant la revendication 1 caractérisé en ce que le sulfate de chondroïtine est choisi dans un groupe comprenant le sulfate de chondroïtine A, le sulfate de chondroïtine B, le sulfate de chondroïtine C et un mélange de deux ou plusieurs de ces composés.
3. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le sulfate de chondroïtine est contenu dans un tampon dit d'équilibration.
4. Procédé suivant la revendication 3 caractérisé en ce que le sulfate de chondroïtine est présent dans le tampon à une concentration de 0,1 à 3% dudit tampon.
5. Procédé suivant la revendication 4 caractérisé en ce que le sulfate de chondroïtine est présent dans le tampon à une concentration de 0,5 à 1% dudit tampon.
6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que le pH du tampon est compris entre 5 et 6.
7. Procédé suivant la revendication 6 caractérisé en ce que le pH du tampon est compris entre 5,2 et 5,8.
8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 3 à 7, caractérisé en ce que le tampon contient un acide choisi parmi les acides maléique, phtalique, 2-3-pyridine dicarboxylique, succinique, dibromo-succinique, mucique, diglycolique, malique et adipique.
9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisé en ce que le tampon contient une base choisie parmi les suivantes: Tris, NaOH, KOH, D-L méthylglucamine, imidazole et pipérazine.
10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le sulfate de chondroïtine est ajouté à l'agarose avant solidification du gel.
11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 3 à 9, caractérisé en ce que le gel est mis à

équilibrer dans du tampon d'équilibration contenant du sulfate de chondroïtine.

- 12.** Procédé suivant la revendication 11 caractérisé en ce que le gel mis à équilibrer est exempt de sulfate de chondroïtine.

5

- 13.** Procédé suivant l'une quelconque des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que le gel est mis à équilibrer pendant trente minutes.

- 14.** Gel d'agarose susceptible d'être obtenu par un procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 13.

10

- 15.** Trousse pour électrophorèse d'hémoglobines comprenant un gel d'agarose suivant la revendication 14, le cas échéant un tampon d'équilibration contenant du sulfate de chondroïtine, et un tampon d'électrophorèse.

15

- 16.** Procédé électrophorétique pour séparer l'hémoglobine glycosylée Hb A1c des autres hémoglobines présentes dans un échantillon de sang complet ou de globules rouges, caractérisé en ce qu'on utilise comme milieu de support pour l'électrophorèse un gel d'agarose suivant la revendication 14.

- 17.** Utilisation du sulfate de chondroïtine dans des gels d'agarose servant de milieu de support d'électrophorèse.

20

25

30

35

40

45

50

55



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 91 87 0219

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
D, A	US-A-4 351 711 (J. AMBLER) * abrégé * ---	1	G01N27/447
D, A	US-A-4 222 836 (R. J. KERR) * abrégé * ---	1	
A	EP-A-0 225 867 (N. TANI) * revendications 1,10 * ---	1	
A	DE-A-3 504 385 (R. H. SAUNDY) * revendications 1,2 * -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			G01N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 13 AVRIL 1992	Examinateur DUCHATELLIER M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			